



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Biosensores electroquímicos, su aplicación en
ciencias farmacéuticas.**

Autor: Adela Izquierdo Guijarro

Tutor: Beatriz López Ruiz

Convocatoria: Febrero

ÍNDICE.

1. Resumen.	3
Abstract.	3
2. Introducción y antecedentes.	3
3. Objetivos.	5
4. Materiales y Métodos.	5
5. Resultados y Discusión.	6
Activación de Linfocitos T y respuesta inmune.	6
Biosensores	10
Diseño de un hipotético inmunosensor electroquímico para la detección de PD-L1 en muestras tumorales.	13
6. Conclusiones.	16
7. Bibliografía.	17

1. Resumen.

Este trabajo se centra en el desarrollo de un hipotético biosensor electroquímico, concretamente un inmunosensor, para la detección de un biomarcador (PD-L1) en muestras de pacientes con diferentes tipos de tumores.

Para ello se llevó a cabo una revisión bibliográfica sobre biosensores electroquímicos y, se estudiaron también, las vías de regulación del sistema inmunitario con el fin de entender la inmunoterapia. Se vio que la vía PD1/PD-L1 tiene un papel importante en el control inmunitario y, por tanto, este biomarcador es clave para el desarrollo de la inmunoterapia.

Abstract.

This work focuses on the development of a hypothetical electrochemical biosensor, an immunosensor, to be precise, for the detection of a biomarker (PD-L1) in samples from patients with different tumor types.

To this end, a bibliographic review about electrochemical biosensors was carried out. In addition, the immune system regulatory pathways were studied in order to understand immunotherapy.

As a result, it was concluded that PD1/PD-L1 pathway plays an important role in the immune control and, therefore, that this biomarker is key for the development of immunotherapy.

2. Introducción y antecedentes.

Durante los últimos años, la inmunoterapia se ha convertido en uno de los pilares fundamentales en el tratamiento del cáncer. Lo que se persigue con ella es potenciar la actividad del sistema inmunitario superando así la capacidad de las células tumorales para resistir a la respuesta inmune endógena¹.

La inmunidad mediada por las células T es determinante en el control de enfermedades infecciosas y cáncer, así como en el desarrollo de tolerancia inmunológica a los antígenos propios¹.

La ruta PD-1/PD-L1 representa por tanto un mecanismo de resistencia inmuno-adaptativa que desarrollan las células tumorales en respuesta a la actividad antitumoral endógena²⁻⁴.

Tras una profunda revisión bibliográfica, consideramos oportuno el estudio de este mecanismo, con el fin de desarrollar fármacos capaces de bloquear esos receptores y que, de esta forma, el proceso tumoral no pase desapercibido para nuestro sistema inmune. Son muchos los estudios que demuestran

que la expresión de PD-L1 en la superficie de la célula tumoral es fundamental para que las células tumorales escapen del sistema inmunitario.

Hasta la fecha, son pocos los fármacos que se han desarrollado con este mecanismo de acción, en la siguiente tabla se hace una relación de ellos, indicando su mecanismo de acción y el tipo de tumor en el que se utilizan:

Tabla 1. Fármacos antitumorales bloqueantes de la ruta PD-1/PD-L1

FÁRMACO	TIPO DE BLOQUEO	TIPO DE TUMOR
Nivolumab (Opdivo) (2015) ^{5,6}	PD1	Melanoma avanzado, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma de células renales, linfoma de Hodking (LH), cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), carcinoma urotelial.
Pembrolizumab (Keytruda) (2015) ^{7,8}	PD1	Melanoma metastásico, CPNM, LHc, carcinoma urotelial, CCECC
Atezolizumab (Tecentriq) (2017) ^{9,10}	PD-L1	CPNM, carcinoma urotelial
Durvalumab (Imfinzi) (2018) ¹¹	PD-L1	CPNM
Avelumab (Bavencio) (2017) ^{12,13}	PD-L1	Carcinoma de Células de Merkel (CCM) metastásico.

Este tipo de fármacos, por tanto, van dirigidos a bloquear PD-1 o su ligando PD-L1. Si las células tumorales del paciente no expresan este tipo de receptores, el tratamiento no es efectivo.

Es por esto que, para llevar a cabo un tratamiento dirigido frente al tumor en estos pacientes, es necesario confirmar la presencia de PD-L1 en células tumorales y, para ello, se plantea el diseño de un hipotético biosensor que permita detectar de manera fiable la presencia de estas proteínas en la muestra, con el fin de evaluar el pronóstico de la enfermedad y predecir la respuesta por parte del paciente al tratamiento con inmunoterapia.

Los biosensores son dispositivos muy atractivos como herramientas analíticas debido a su corto tiempo de análisis, capacidad de inclusión en sistemas integrados, capacidad de trabajar a tiempo real, facilidad de automatización, versatilidad y bajo coste^{14,15}.

Desde el 1956, año en el que Clark desarrolla el primer biosensor, y hasta la fecha, se ha avanzado mucho en este campo. El desarrollo tecnológico ha hecho que ya casi pueda medirse cualquier parámetro biológico o químico a bajas concentraciones y cada vez de forma más fiable¹⁶⁻¹⁸

3. Objetivos.

- El primer objetivo del trabajo recoge el estudio de la respuesta inmunitaria y la importancia de los “checkpoints” o puntos de control inmunológicos en la inmunoterapia.
- El segundo objetivo de este trabajo, y no por ello menos importante, consiste en llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre los biosensores electroquímicos y proponer un hipotético biosensor capaz de detectar el analito de interés, la proteína PD-L1, pues de esta forma podemos determinar si el paciente es PD-L1 positivo y en función de eso, establecer un tratamiento lo más dirigido posible.

4. Materiales y Métodos.

Se realizó una revisión bibliográfica dedicada al estudio de los biosensores como dispositivos analíticos y se consultaron también diferentes fuentes bibliográficas sobre el sistema inmunitario y sus vías de regulación.

Se llevó a cabo una revisión sistemática en las principales bases de datos bibliográficas (PubMed, SCOPUS, SciELO, MedScape, MEDLINE, ISI Web of Knowledge, Toxnet) y en revistas científicas consultadas a través de internet (Journal of Immunology, British Society of Immunology, British Journal of Cancer, European Journal of Cancer, etc), así como páginas web de organismos internacionales (AECC, NCI, OMS, NIH, AEMPS, EMA).

Fueron definidos unos criterios de inclusión y exclusión en función de la fecha de publicación de los artículos, siendo elegidos aquellos estudios publicados en los últimos años y que ofrecían información relevante acerca de los biosensores electroquímicos y su aplicación en el campo de las ciencias farmacéuticas.

5. Resultados y Discusión.

Activación de Linfocitos T y respuesta inmune.

Los linfocitos T, también llamados TDR, expresan receptores en su membrana que les permiten reconocer los antígenos de superficie de una célula tumoral y éstos se activan para eliminarla¹⁹.

La activación de las células T requiere de tres procesos principales^{20,21}:

- Interacción del Receptor de la célula T (TCR) con el antígeno (Ag) unido al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA).
- Interacción de moléculas co-estimuladoras (B7) expresadas sobre las células presentadoras de antígenos (CPA) con ligandos específicos localizados sobre las células T (CD-28 y CTLA-4, expresados en la superficie de linfocitos T CD4+ y CD8+).

Esta interacción puede emitir señales positivas o negativas que activan o inhiben la función de la célula T.

- Diferenciación de las células T hacia varios fenotipos efectores: Th1 y Th2.

Pero, de la misma forma, también es necesaria una señal de stop que asegure que no se producirá una sobreactivación de estos linfocitos y así no se produzcan daños autoinmunes.

Una de las vías por las que se regula esta activación de los linfocitos T, y en la que se centra este trabajo, es mediante receptores de inhibición como el PD-1 (receptor de muerte programada, también conocido como CD279), presente en la superficie de las células T.

Tras la activación, los linfocitos T aumentan la expresión del receptor PD-1 que les permitirá recibir la señal de desactivado. Esta señal se producirá tras la unión de este receptor a su ligando PD-L1 o PD-L2, que normalmente se expresan en la superficie de células dendríticas y macrófagos, y que provocará la reducción de la producción de citoquinas y la supresión de la proliferación de las células T.

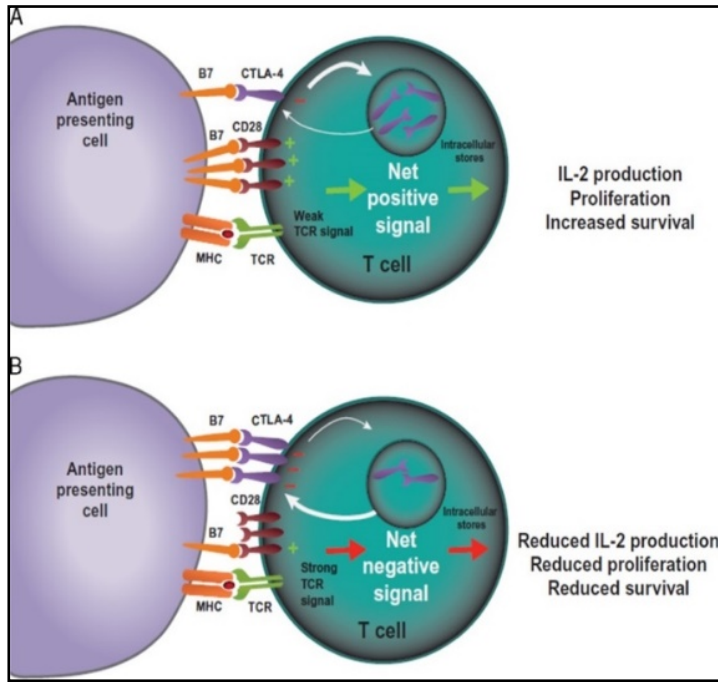


Figura 1. Inhibición de células T mediada por CTLA-4.

A, en el caso de un estímulo de TCR débil, predomina la unión a CD28: B7, lo que da como resultado una señal de activación positiva neta y una producción, proliferación y aumento de la supervivencia de IL-2.

B, en el caso de un fuerte estímulo de TCR, la expresión de CTLA-4 se regula al alza mediante un aumento del transporte a la superficie celular desde los almacenes intracelulares y una menor internalización². American Journal of Clinical Oncology 39(1):98-106, February 2016.

Se trata, por tanto, de una vía de regulación negativa en la activación de las células T, conociéndose estos receptores como puntos de control inmunológico (*checkpoints*)^{20,21}.

Y es, precisamente, este mecanismo el que han integrado multitud de tumores con el fin de bloquear el reconocimiento de los mismos mediante la expresión en su superficie de las proteínas PD-L1 y PD-L2, logrando escapar así de la acción del sistema inmune y continuar proliferando^{20,21}.

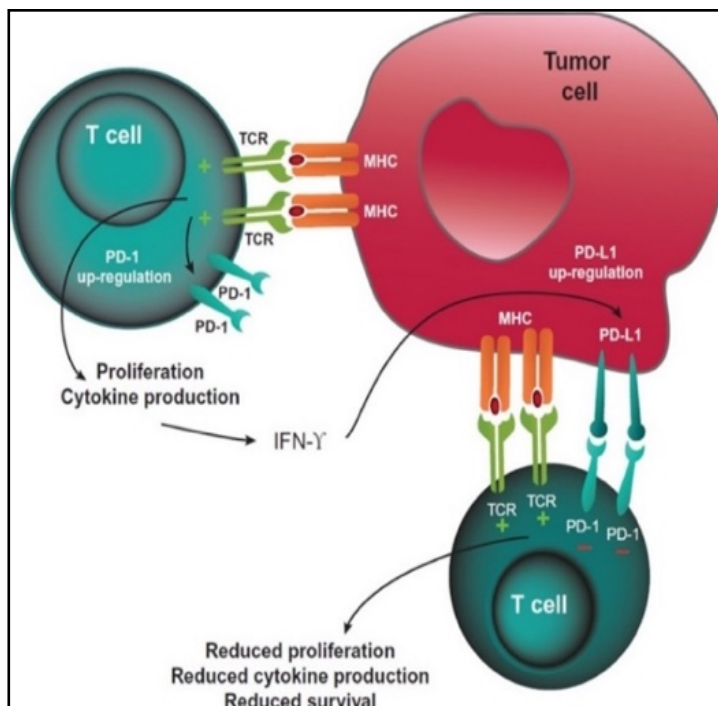


Figura 2. Inhibición de células T mediada por PD-L1.

La estimulación prolongada de TCR durante una respuesta inmune en curso puede causar una expresión de PD-1 regulada al alza. Las células tumorales pueden expresar PD-L1 como consecuencia de citoquinas inflamatorias y / o vías de señalización oncogénicas. PD-1: La unión de PD-L1 inhibe la señalización positiva mediada por TCR, lo que lleva a una proliferación reducida, una menor secreción de citoquinas y una menor supervivencia².

American Journal of Clinical Oncology 39(1):98-106, February 2016.

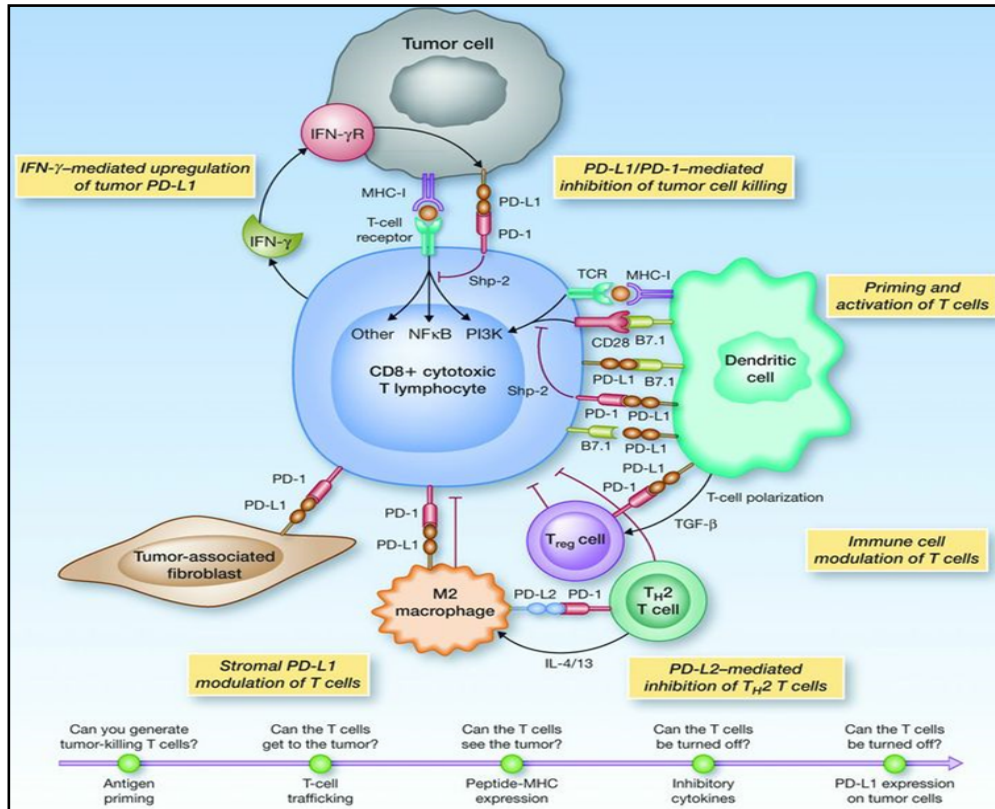


Figura 3. Tumor Immunology and the PD-L1/PD-1 pathway. American Association for Cancer Research 18(24):9, 2012

Numerosos estudios demuestran que bloqueando el receptor PD-1 presente en la superficie de los linfocitos, o los ligandos PD-L1 y PD-L2 expresados en células tumorales, se impedía la unión receptor-ligando y, por consiguiente, no se producía la señal inmunomoduladora, permitiendo así que las células T continuaran activas contra el tumor^{22,23}. Esto ha supuesto nuevas perspectivas en la aplicación clínica.

Numerosos ensayos clínicos con anticuerpos anti PD-1 y PD-L1 que se llevaron a cabo, han señalado resultados prometedores, especialmente en cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, carcinoma renal y cáncer de vejiga^{24,25}.

Por otra parte, con relación al pronóstico de la enfermedad, se ha visto que el PD-L1 puede ser un marcador pronóstico útil en el cáncer de mama, pues valores altos de este ligando en células tumorales se relacionó con mayor tamaño del tumor y metástasis en ganglios linfáticos²⁶.

En relación con esto, se han desarrollado anticuerpos monoclonales frente al PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab) y PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab), conocidos como inhibidores de puntos de control inmunológicos (Tabla 1).

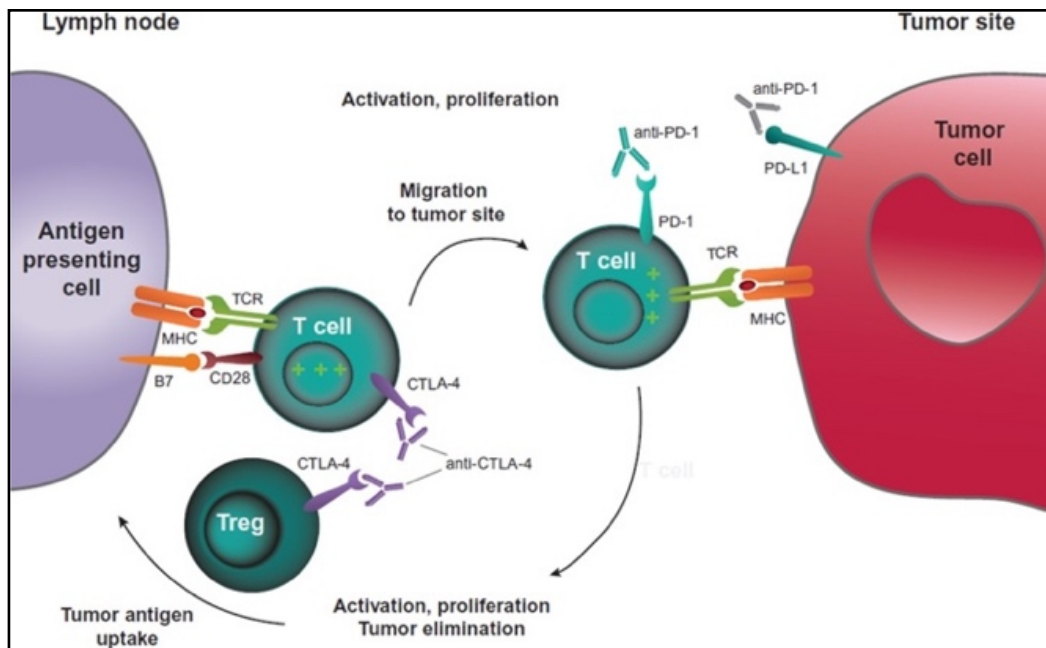


Figura 4. Bloqueo de vías CTLA-4 y PD-1. El bloqueo de CTLA-4 permite la activación y proliferación de más clones de células T, y reduce la inmunosupresión mediada por los linfocitos T reguladores, (Treg). El bloqueo de la ruta PD-1 restablece la actividad de las células T antitumorales que se han vuelto inactivas. Un bloqueo de doble vía podría tener un efecto sinérgico, dando como resultado una respuesta inmune antitumoral más larga y más duradera². American Journal of Clinical Oncology 39(1):98-106, 2016.

Todo esto pone de manifiesto la importancia de PD-L1 en la inmunoterapia. Se trata de una glicoproteína que se expresa en leucocitos, células no hematopoyéticas, tejidos no linfáticos, y se comprobó que está aumentada en muchos tipos de tumores sólidos humanos: melanoma, pulmón, ovario, estroma gastrointestinal (GIST), etc. Hay estudios que demuestran que su presencia también está asociada con un aumento en la cantidad de linfocitos infiltrados de tumor.

El PD-1, como ya he dicho, es una glicoproteína transmembrana formada por 288 aminoácidos y con un peso molecular entre 50-55 kDa. A pesar de su homología con CD-28 y CTLA-4 carece de dominio MYPPPY necesario para interactuar con CD-80 Y CD-86, y no puede unirse a ellas. Uno de sus ligandos es la glicoproteína transmembrana PD-L1, formada por 290 aminoácidos y perteneciente a la familia B7 (B7-H1)^{27,28}.

El incremento de la expresión de PD-L1 es uno de los mecanismos que permiten al cáncer evadir el ataque del sistema inmunitario. En algunos tipos, como el carcinoma renal, los niveles de expresión de PD-L1 se correlacionan con la agresividad del mismo²⁹.

Debido a su papel en el desarrollo del tumor, es importante detectarla en la muestra del paciente para, de esta forma, establecer un tratamiento lo más dirigido posible. Con el objetivo de detectar la presencia de PD-L1 en muestras tumorales, se diseñará un dispositivo analítico específico, un inmunosensor.

Biosensores

De acuerdo con la IUPAC, un biosensor es un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico, o biomimético, íntimamente asociado a un transductor fisicoquímico y que, en presencia del analito, produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo en la muestra³⁰. (Fig. 5).

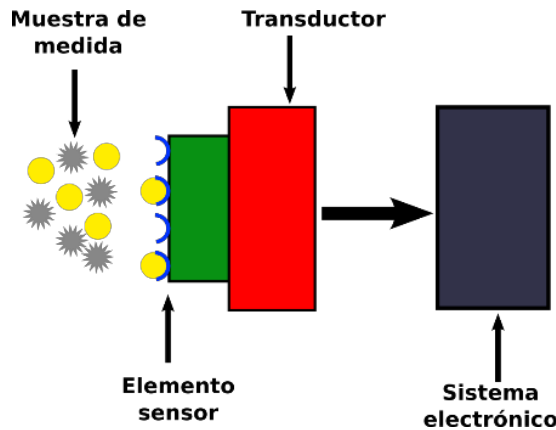


Figura 5. Esquema general de un biosensor.

En cuanto a la perspectiva histórica, el primer biosensor fue desarrollado por el profesor Leland C. Clark Jr. quién, basándose en el electrodo de oxígeno (1956) vio la oportunidad de incrementar las posibilidades analíticas de los sensores electroquímicos, mediante la incorporación de una enzima atrapada con una membrana semipermeable³¹.

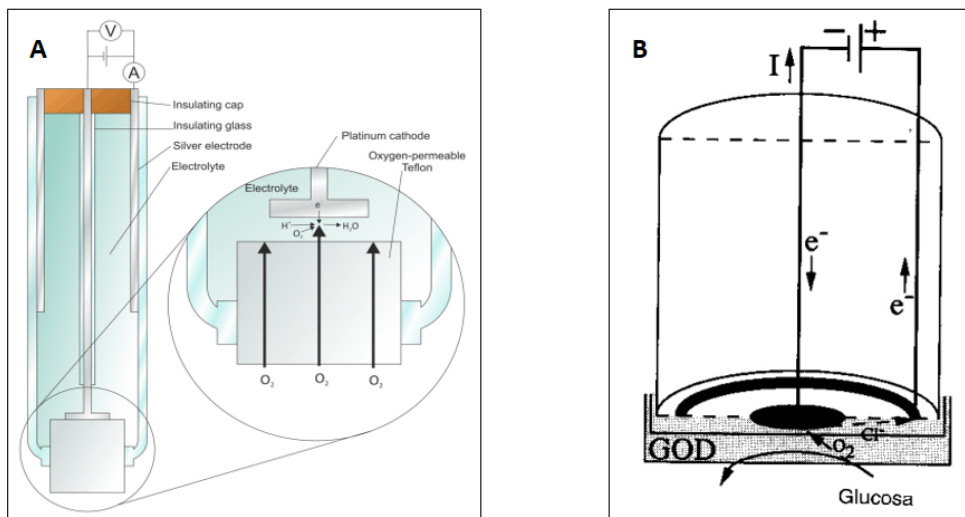
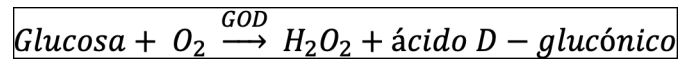


Figura 6. A: Electrodo de Clark para medir oxígeno en sangre. B: Biosensor amperométrico para la medida de glucosa basado en el electrodo de oxígeno de Clark y la incorporación de glucosa oxidasa (GOD).

En la figura 6.A. se muestra el electrodo diseñado por Clark para medir oxígeno. En un experimento posterior, la enzima glucosa oxidasa, GOD, fue confinada en la proximidad del electrodo de platino, mediante una membrana de diálisis (Fig. 6.B) donde tiene lugar la siguiente reacción enzimática:



La enzima glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa presente en la muestra mediante la acción del oxígeno como aceptor de electrones, la medida del descenso de oxígeno en el medio se relacionó con el contenido en glucosa. Se acuñó así el término de “electrodo enzimático”. Término que fue implementado en 1967 por Updike y Hicks³².

Posteriormente, en el 1975, la compañía *Yellow Springs Instrument (Ohio)* comercializó el primer electrodo enzimático de Clark (Fig. 7). La enzima glucosa oxidasa se sitúa entre membranas en la proximidad de un electrodo de platino. Uno de los productos obtenidos en la reacción catalizada por la glucosa oxidasa es el peróxido de hidrógeno y éste es oxidado a 700mV (versus a un electrodo de calomelanos saturado, como electrodo de referencia) en la superficie del electrodo de platino, produciendo una corriente eléctrica que es directamente proporcional a la cantidad de glucosa en la muestra (detección amperométrica de peróxido de hidrógeno).

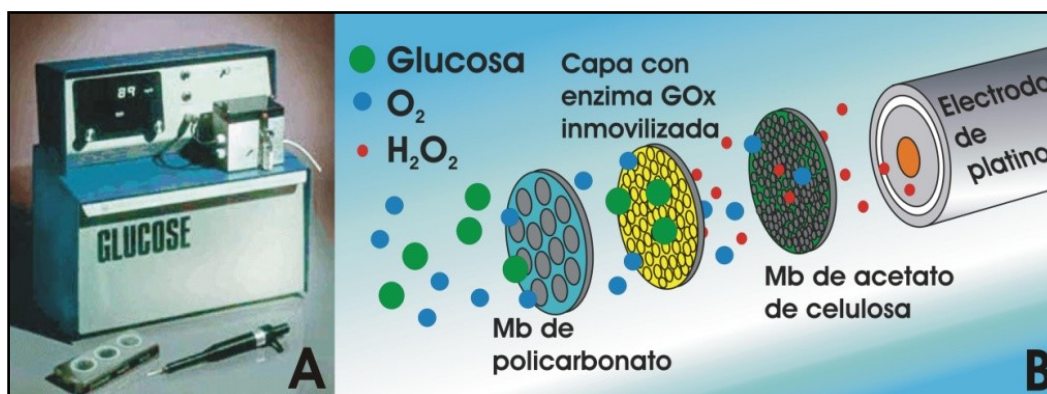


Figura 7. (A) Primer biosensor comercial de glucosa (YSI), y (B) estructura interna del sistema, donde se muestra la capa de enzima inmovilizada entre dos membranas.

Desde entonces, el desarrollo de los biosensores ha sido espectacular, sobre todo en el campo de la medicina y, concretamente, del diagnóstico clínico, pero es importante señalar su acción en otros campos como el medioambiental, la industria farmacéutica (desarrollo de nuevos fármacos) y agroalimentaria, por citar algunos^{33,34}.

Existen varios tipos de biosensores cuya clasificación atiende a diferentes criterios³⁵:

- Teniendo en cuenta el sistema de transducción. En este punto diferenciamos transductores electroquímicos, ópticos, máxicos, termométricos, piezoeléctricos y nanomecánicos.

Dentro de los biosensores electroquímicos, se encuentran cuatro tipos: potenciométricos (miden la diferencia de potencial generada por algún componente de la reacción específica entre el analito y el elemento de reconocimiento manteniendo la corriente constante y utilizando electrodos selectivos para ciertos iones), conductimétricos (detectan cambios en la conductancia, asociados con cambios en el contenido iónico de la disolución medida), amperométricos e impedimétricos (determinan corrientes eléctricas asociadas a reacciones de óxido-reducción) y de carga iónica o efecto de campo (detectan cambios en la densidad de carga-transistor ISFET) .

- En función del modo en el que interaccionan el elemento de reconocimiento y el analito, pueden ser sensores biocatalíticos o sensores de bioafinidad. Los primeros se basan en la utilización de catalizadores biológicos. Finalizada la reacción química, el biocatalizador se regenera y puede ser reutilizado. A este grupo pertenecen los biosensores enzimáticos.

Los segundos se basan en una reacción de afinidad entre el elemento de reconocimiento y el analito sin que tenga lugar una transformación catalítica. A este grupo pertenecen los inmunosensores y los genosensores.

- En función de la naturaleza del elemento de reconocimiento (enzima, anticuerpo, ácido nucleico, aptámero) distinguimos entre biosensor enzimático, inmunosensor, genosensor y aptasensor.
- Según la metodología utilizada para la detección del analito, que puede ser directa o indirecta. En el caso de los inmunosensores, a modo de ejemplo, la aplicación de un método indirecto implica, a diferencia de los directos, el empleo de dos anticuerpos que reaccionan con el antígeno, el primero actuará como anticuerpo de captura y el segundo irá marcado y actuará como anticuerpo de detección.

Diseño de un hipotético inmunosensor electroquímico para la detección de PD-L1 en muestras tumorales.

En este punto se va a diseñar un inmunosensor que lleva inmovilizado un Ac específico, como elemento de reconocimiento.

Los biosensores constan de dos partes:

- *Elemento de bio-reconocimiento* que interactúa con el analito de forma específica y le confiere selectividad al biosensor.
- *Transductor*, responsable de convertir esa interacción en una señal analítica. La adecuada elección del transductor permitirá la cuantificación de bajas concentraciones de analito.

Ambos componentes tienen que estar íntimamente unidos, por ello se requiere de la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre la superficie del transductor.

Seleccionamos como transductor electroquímico, un electrodo de oro serigrafiado debido, en primer lugar, a la reacción espontánea que tiene lugar entre el oro y los grupos que contienen azufre, esto nos permite inmovilizar el Ac, funcionalizado con grupos tiol en un extremo, de forma que se formen monocapas autoensambladas en la superficie del electrodo de forma espontánea y sencilla. Y segundo por tratarse de electrodos desechables³⁶.

En cuanto al anticuerpo específico, se procede a su funcionalización con grupos tiol en uno de sus extremos. Para su inmovilización sobre el electrodo, se añade un volumen de dicho anticuerpo funcionalizado sobre la superficie electródica y espontáneamente se forma la monocapa autoensamblada (SAM) (self assembled monolayers), mediante uniones covalentes entre los tioles y el oro y por las interacciones de Van der Waals entre las cadenas alquílicas (Fig. 8). Estas monocapas son sistemas autoorganizados muy extensamente estudiados³⁶.

Para controlar la densidad de puntos de unión del Ac a la superficie se requiere una molécula espaciadora. Esta molécula es un alcanotiol de cadena más corta y con grupos no reactivos en el otro extremo, se introduce en la monocapa, dando lugar a una SAM mixta. De esta forma disminuyó el número de interacciones inespecíficas y se vio aumentada la prevención de la desnaturalización de proteínas, en comparación con las SAMs de un único tiol³⁶.

Una vez inmovilizado el Ac de captura al electrodo de trabajo, se procede al lavado con un tampón de inmovilización, para eliminar el exceso de antígeno no unido al anticuerpo de captura.

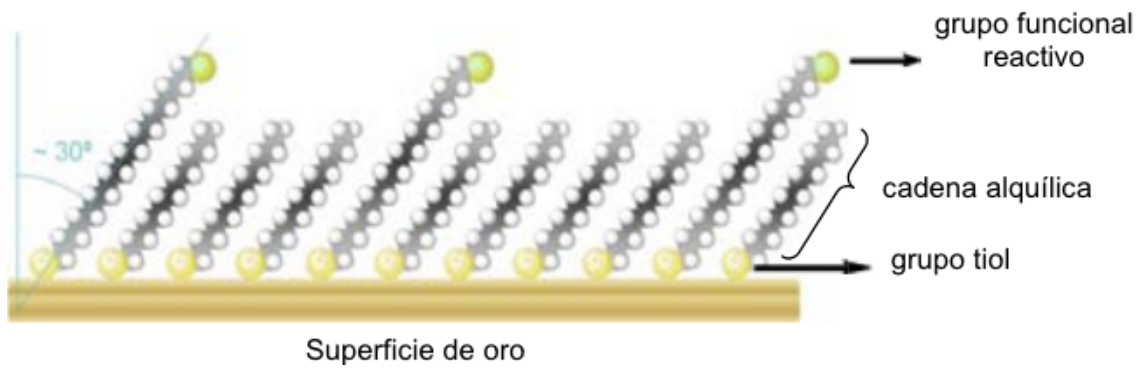


Figura 8. Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial. Tesis doctoral 2013, Elena Juan de Franco. Universidad Autónoma de Barcelona

Y es ahora cuando se añade la disolución con la muestra del paciente donde se encuentra el analito a detectar, PD-L1.

El siguiente paso consiste en añadir un segundo Ac biotinilado llamado Ac de detección. Este segundo Ac presenta afinidad por el analito de modo que se une al analito inmovilizado por el Ac de captura tal y como se muestra en la figura 9:

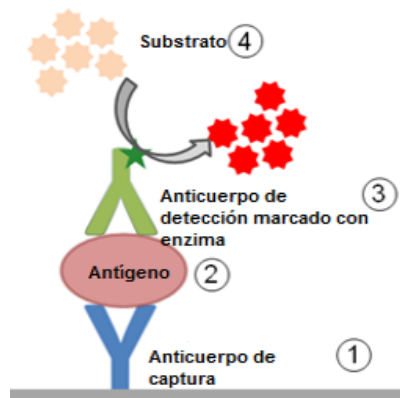


Figura 9. Ensayo tipo sándwich.

Concluida la reacción con el anticuerpo de detección se vuelve a lavar con la disolución tampón para eliminar el exceso de anticuerpo. Se ha optado por un marcaje enzimático que nos permita realizar la detección electroquímica, en este caso se trata de un conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina. Se utiliza este conjugado debido a la elevada afinidad de la proteína estreptavidina por la biotina, forma una de las interacciones no covalentes más fuertes que se conocen, presenta una $K_d = 10^{-14}$ M. De esta forma aseguramos el marcaje del segundo anticuerpo con fosfatasa alcalina^{37,38}.

Antes de agregar la disolución con el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina, para minimizar la adsorción no específica del electrodo, se cubre el electrodo con una disolución tampón de bloqueo durante 10 min y posteriormente se añade la disolución del conjugado estreptavidina-fosfatasa.

Tras 10 min de incubación, se añade una disolución de 1-naftil fosfato (sustrato de la fosfatasa alcalina) que, por acción de la enzima se transforma en 1-naftol.

La detección del analito se basa en la medida de la corriente de oxidación del 1-naftol, procedente de la hidrólisis enzimática del 1-naftilfosfato, mediante voltamperometría de impulsos diferencial³⁹ (Fig. 10). Para ello se realiza un barrido de potencial entre 0 y +0,6 V. En la Figura 11 se muestra la relación que existe entre la corriente de oxidación medida y la concentración de analito.

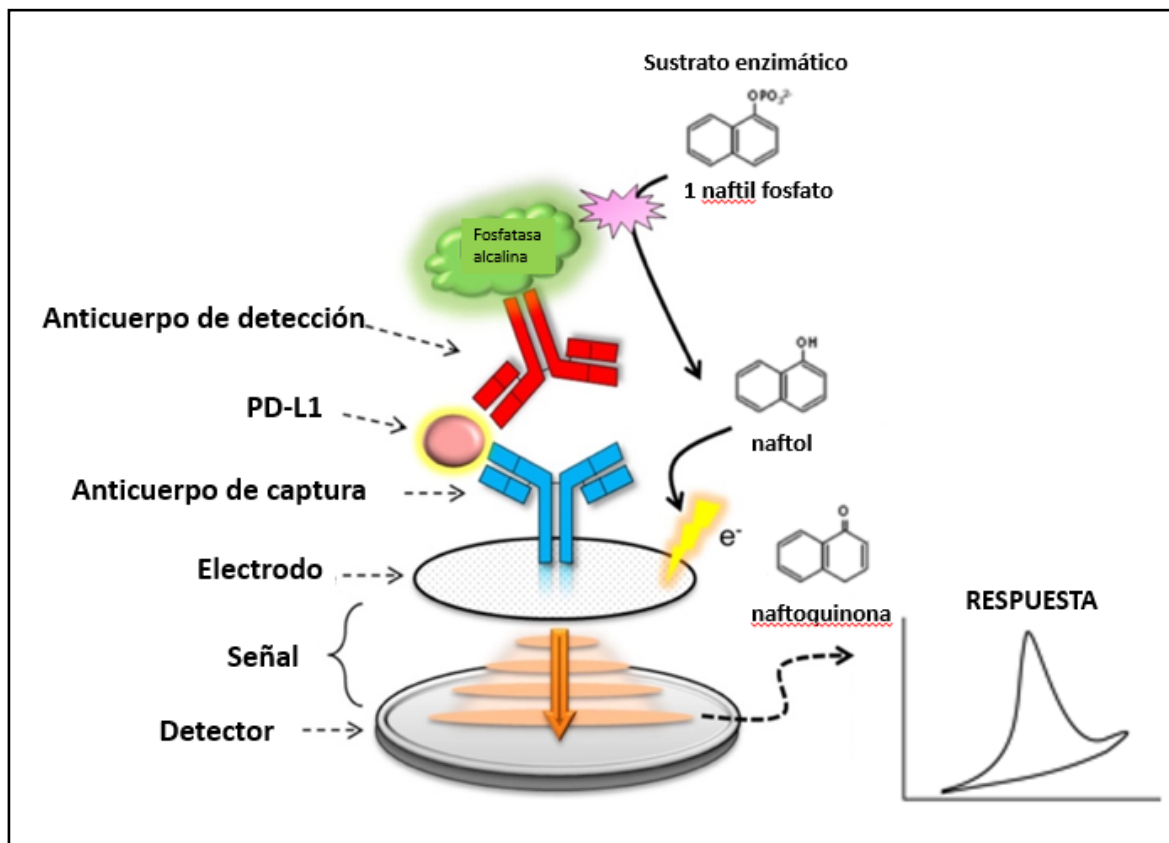


Figura 10. Esquema del inmunosensor diseñado para la detección de la proteína PD-L1.

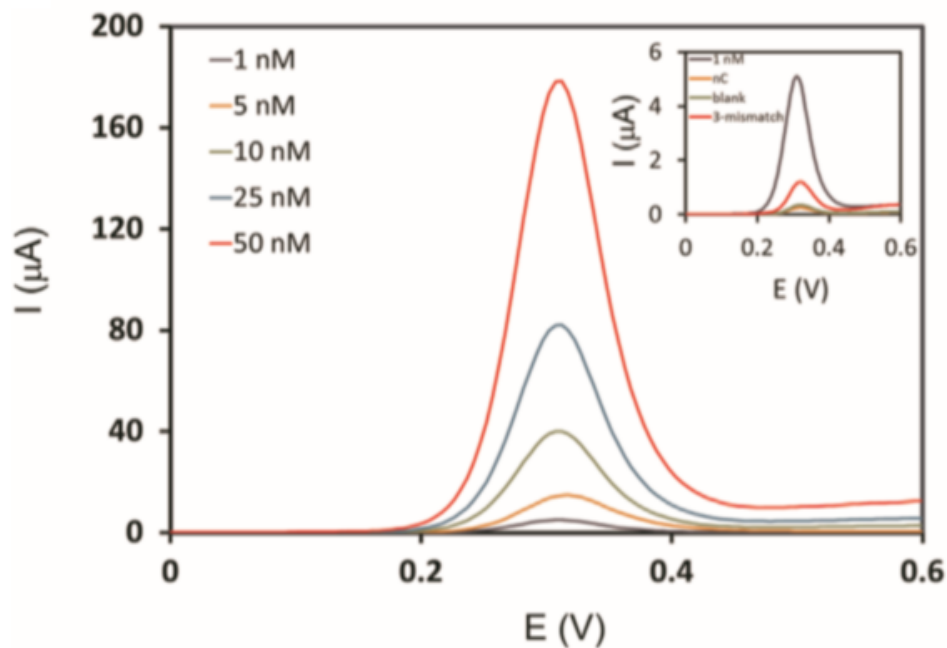


Figura 11. Respuesta típica obtenida en voltametría de impulsos diferencial. Marta Sánchez-Paniagua López, Gloria Frutos Cabanillas, M. Jesús Lobo Castañón, Beatriz López-Ruiz, Development of a genosensor for peanut allergen ARA h 2 detection and its optimization by surface response methodology. *Biosens. Bioelectron.* 62(2014) 350–356.

6. Conclusiones.

1. El sistema inmune representa una atractiva diana terapéutica y, su estudio nos resulta de gran ayuda para entender el pronóstico de una enfermedad y su abordaje terapéutico.
2. La vía del receptor de muerte programada (PD-1) y su ligando (PD-L1) es clave para la inhibición de la respuesta inmune.
3. Recientemente, fármacos anti-PD-1 y anti-PD-L1 han demostrado resultados prometedores en pacientes con tumores sólidos.
4. Estudios recientes demuestran cómo altos niveles de expresión de PD-L1 en tejido tumoral se asocian con una mayor probabilidad de respuesta a la inmunoterapia.
5. Es importante desarrollar herramientas que nos permitan establecer un buen diagnóstico de la enfermedad y de esta forma, poder instaurar un tratamiento lo más dirigido posible. En este punto tienen una gran importancia los dispositivos analíticos conocidos como biosensores.
6. En los últimos años se ha visto aumentado el desarrollo de los biosensores electroquímicos, en todas sus modalidades, biosensores enzimáticos, inmuno, geno y aptasensores, por sus interesantes características y aplicaciones, sobre todo en el campo de las ciencias farmacéuticas.
7. Debido a las características de la proteína PD-L1, es posible diseñar un inmunosensor electroquímico y un ensayo tipo sándwich, en el que, un anticuerpo de captura permita la

inmovilización del antígeno (PD-L1) para su posterior reconocimiento con un anticuerpo de detección que genere una señal proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra.

8. Los biosensores son una excelente alternativa a los métodos de inmunoensayo ELISA convencionales, ya que estos últimos presentan un coste elevado, largos tiempos de detección, difícil automatización y miniaturización, procedimientos complicados de lavado y preparación de la muestra.
9. Los electrodos serigrafiados presentan importantes ventajas frente a los electrodos convencionales por tratarse de electrodos desechables que, además permiten el análisis de micro volúmenes de muestra, factor importante cuando se trata de muestras clínicas.

7. Bibliografía.

1. Disis ML. Mechanism of Action of Immunotherapy. *Semin Oncol.* 2014; 41(5): S3-S13.
2. Larbcharoensub N, Mahaprom K, Jiarpinitnun C, Trachu N, Tubthong N, Pattaranutaporn P et al. Characterization of PD-L1 and PD-1 Expression and CD8+ Tumor-infiltrating Lymphocyte in Epstein-Barr Virus-associated Nasopharyngeal Carcinoma. *Am. J Clin Oncol.* 2018; 41(12): 1204-1210.
3. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Borczuk AC, Cagle PT et al. Programmed Death Ligand-1 immunohistochemistry. A new challenge for pathologists: a perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med.* 2016; 140(4):341-344.
4. Prelaj A, Tay R, Ferrara R, Chaput N, Besse B, Califano R. Predictive biomarkers of response for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer. *E J Cancer.* 2019; 106(1):144-159.
5. EMA. Ficha técnica Nivolumab. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/opdivo-epar-product-information_es.pdf.
6. AEMPS. Informe de Posicionamiento terapéutico Nivolumab. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-nivolumab-Opdivo.pdf>.
7. EMA. Ficha técnica Pembrolizumab. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/keytruda-epar-product-information_es.pdf.

8. AEMPS. Informa de Posicionamiento terapéutico Pembrolizumab. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-pembrolizumab-Keytruda.pdf>.
9. EMA. Ficha técnica Atezolizumab. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/documents/overview/tecentriq-epar-summary-public_es.pdf.
10. AEMPS. Informe de Posicionamiento terapéutico Atezolizumab. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-atezolizumab-Tecentriq-cancer-pulmon.pdf>.
11. EMA. Ficha técnica Durvalumab. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/documents/smop-initial/chmp-summary-positive-opinion-imfinzi_en.pdf.
12. EMA. Ficha técnica Avelumab. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/bavencio-epar-product-information_es.pdf.
13. AEMPS. Informe de Posicionamiento terapéutico Avelumab. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-avelumab-Bavencio-carcinoma-celulas-Merkel.pdf>.
14. González MB, Costa A. Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. Asturias: Grupo de Inmuno electroanálisis, Dpto. de Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo. p. 197-222.
15. Ortega F, Vilas V. Biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. En: Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid; 2006.
16. Cho I, Lee J, Kim J, Kang M, Kyung J, Ku S et al. Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification. Sensors. 2018; 18(1):18.
17. Sonuç MN, Kemal M. Determination of C-reactive protein by PAMAM decorated ITO based disposable biosensing system: a new immunosensor design from an old molecule. Talanta. 2018; 186(1):162-168.
18. Bakirhan NK, Ozcelikay G, Ozkan SA. Recent progress on the sensitive detection of cardiovascular disease markers by electrochemical-based biosensors. JPBA. 2018; 159(1):406-424.
19. Delves P, Martin S, Burton D, Roitt I. Roitt Inmunología Fundamentos. México: Editorial Médica Panamericana; 2014.

20. Buchbinder E, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am. J Clin Oncol.* 2016; 39(1):98-106.
21. Chen D, Ivring B, Stephen F. Molecular pathways: next generation immunotherapy- inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18(24):6580-7.
22. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, Beasley MB, Borczuk AC, Cagle PT et al. Programmed Death Ligand-1 immunohistochemistry. A new challenge for pathologists: a perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Pathol Lab Med.* 2016; 140(4):341-344.
23. Houston R, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Scott W et al. Coestimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101(49):17174-17179. Cedrés Pérez SM. Análisis de la expresión de PD-L1 en una serie de pacientes con mesotelioma pleural maligno. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2014.
24. McDermott DF, Sosman JA, Sznol M, Massard C, Gordon MS, Hamid O et al. Atezolizumab, an anti-programmed death-ligand 1 antibody, in metastatic renal cell carcinoma: long-term safety, Clinical activity, and immune correlates from a phase Ia study. *J Clin Oncol.* 2016; 34(8):833-842.
25. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanzetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, Park K. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2, randomised controlled trial.
26. Kim HM, Lee J, Koo JS. Clinicopathological and prognostic significance of programmed death ligand-1 expression in breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2017; 17(1):11.
27. Vargas-Rojas MI, Jiménez-Alvarez L, Ramírez G, Torres-García D, Barquera R, Zúñiga J et al. PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2008; 21(4):272-279.
28. Cheng X, Veverka V, Radhakrishnan A, Walters LC, Muskett FW, Morgan SH et al. Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J Biol Chem.* 2013; 288(17):11771-11785.
29. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366(26):2443-54.
30. Thevenot D, Tóth K, Durst A, Wilson G. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* 1999; 71(12):2333-2348.

31. Clark, LC. Monitoring and control of blood and tissue oxygen tensions. *Trans. Am. Soc. Art. Internal Organs.* 1956; 2:41-49.
32. Updike SJ, Hicks GP. The enzyme electrode. *Nature.* 1967; 214:986-988
33. Gonzalo Ruiz J. Desarrollo de biosensores enzimáticos miniaturizados para su aplicación en la industria alimentaria. [Tesis doctoral]. Barcelona: Dpto de Química. Facultad de Ciencias. UAB; 2006.
34. Ocampo A, March C, Montoya A. Inmunosensores piezoeléctricos: revisión general y su aplicación en el análisis de pesticidas. *EIA.* 2007; 7(1):97-110.
35. Fernández Ojeda I. Inmunosensores electroquímicos para la determinación de marcadores de la obesidad. [Tesis doctoral]. Madrid: Dpto. Química analítica. Facultad de Químicas. UCM; 2015.
36. Juan de Franco E. Estrategias de inmovilización de anticuerpos para la detección directa de hormonas mediante Inmunosensores de Resonancia de Plasmón Superficial. [Tesis doctoral]. Barcelona: Dpto. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. UAB, 2013.
37. Gutiérrez-Zuñiga GG, Hernández-López JL. Sensitivity improvement of a sandwich-type ELISA immunosensor for the detection of different prostate-specific antigen isoforms in human serum using electrochemical impedance spectroscopy and an ordered and hierarchically organized interfacial supramolecular architecture. *Analytica Chimica Acta.* 2016; 902(1):97-106.
38. Martín B, Miranda AJ, Lobo MJ, Frutos G, de los Santos N, López B. Strongly structured DNA sequences as targets for genosensing: sensing phase design and coupling to PCR amplification for a highly specific 33-mer gliadin DNA fragment. *Biosensors and Bioelectronics* 2014; 60(1):244-251.
39. Martín B, Miranda AJ, Lobo MJ, Frutos G, de los Santos N, López B. Development of a genosensor for peanut allergen ARA h 2 detection and its optimization by Surface response methodology. *Biosensors and Bioelectronics.* 2014; 62(1):350-